Aus dem Röntgeninstitut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. Liechti
Arbeit unter Leitung von Dr. W. Minder

Über den Mitosenablauf bei röntgenbestrahlten Wurzelkeimlingen der Vicia faba equina

Beitrag
zum Studium der Strahlenwirkung
auf das Wachstum

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Medizin
der hohen medizinischen Fakultät der Universität Bern

Vorgelegt von
HANS ZEHNDER
aus Ettenhausen

1943

Druck von H. Bircher, Sulgen

Aus dem Röntgeninstitut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. Liechti
Arbeit unter Leitung von Dr. W. Minder

Über den Mitosenablauf bei röntgenbestrahlten Wurzelkeimlingen der Vicia faba equina

Beitrag
zum Studium der Strahlenwirkung
auf das Wachstum

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Medizin
der hohen medizinischen Fakultät der Universität Bern

Vorgelegt von
HANS ZEHNDER
aus Ettenhausen

1943

Druck von H. Bircher, Sulgen

Von der medizinischen Fakultät der Universität Bern auf Antrag von Herrn Prof. Liechti zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 28. Oktober 1942.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:
Prof. Dr. A. v. Muralt.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I. Einteilung: Rahmen und Problemstellung.

Die Dosis einer Röntgenstrahlung, mit andern Worten das Produkt aus Strahlungsintensität und Bestrahlungsdauer, kann verhältnismäßig einfach und genau gemessen werden mittels Röntgendosimeter. Dieser physikalische Meßapparat beruht auf der luftionisierenden Wirkung der Röntgenstrahlen und der dadurch bewirkten Leitfähigkeit der Luft.

Da nun aber in der Medizin die biologische Wirkung der Röntgenstrahlen besonders bedeutsam ist, stellt sich die grundsätzliche Frage, ob einer physikalisch gemessenen Energie eine bestimmte biologische Wirkung zukommt. Die einfachste Annahme wäre die, daß die Strahlenwirkung der Dosis proportional sei. So hätte also eine physikalisch gemessene Dosis A die biologische Wirkung p . A; und die Dosis B hätte biologisch eine Wirkung von p . B, wobei der Proportionalitätsfaktor p in beiden Fällen derselbe wäre.

Diese Annahme bedarf der Abklärung. Die Grundfrage der Strahlentherapie lautet: Innerhalb welcher Grenzen ist eine Proportionalität zwischen physikalischer Dosis und biologischer Wirkung der Röntgenstrahlen tatsächlich vorhanden?

Wie aus zahlreichen Arbeiten am hiesigen Institut besonders durch die Untersuchungen von Doelken, Lenherr, Salzmann und de Simoni hervorgeht, gilt die Proportionalität nicht im mathematisch linearen Sinne. In den Arbeiten des hiesigen Institutes wurde neben anderen Versuchen auch die Wirkung der Röntgenstrahlen auf das tägliche Längenwachstum von Pfahlwurzeln untersucht. Das biologische Objekt war die

Pferdebohne (Vicia faba equina). Frisch keimende Bohnensaaten wurden mit verschiedenen Röntgendosen bestrahlt und darnach der tägliche Längenzuwachs der Pfahlwurzeln bestimmt. Die Ergebnisse waren eindeutig: Kleine Strahlendosen (Größenordnung bis etwa 20 r) bewirken eine Wachstumsbeschleunigung, Zwischenwerte von 30—50 r lassen das Wachstum praktisch unbeeinflußt, große Dosen (Größenordnung von 50 r an) schädigen das Wachstum. Diese Schädigung ist der Strahlungsdosis ziemlich genau proportional.

Es bestehen zunächst zwei Hypothesen, welche diese Erscheinungen erklären könnten:

1. Die Röntgenstrahlen lösen im biologischen Objekte zwei durchaus verschiedene Reaktionen aus. Die eine bewirkt die Wachstumsbeschleunigung, die andere die Wachstumshemmung. Das tatsächliche, tägliche Längenwachstum ist die Resultante beider Reaktionen.

2. Die Röntgenstrahlen mobilisieren im biologischen Objekte einen bestimmten Wachstumsfaktor. Dieser begünstigt in kleinen Mengen das Wachstum, in großen Mengen aber führt er zu einer Schädigung.

Um diese Wachstumsphänomene zu klären, haben Jüngling und Langendorff, gestützt auf die Versuche von Glocker, Hayer und Jüngling, die Untersuchung des Bohnenwachstums mit einer verfeinerten Methodik weitergeführt.

Es war anzunehmen, daß Wachstum und Mitosenzahl irgendwie proportional verlaufen. Schwankungen im Längenwachstum müssen sich also auch als Schwankungen in der Mitosenstatistik ausdrücken. Zudem müssen durch die mikroskopischen Untersuchungen der Wurzelkeimlinge neue Erkenntnisse über die Zellvorgänge unter dem wechselnden Einfluß von Wachstum und Strahlung gesammelt werden können.

Jüngling und Langendorff untersuchten die Prozentsätze der Mitosen unbestrahlter Wurzelspitzen der Vicia faba equina zu bestimmten Tageszeiten. Sie fanden dabei tageszeitliche Schwankungen im Sinne eines mittäglichen Maximums und eines nächtlichen Minimums. In weiteren Versuchsreihen stellten sie eine Statistik der Mitosenprozentsätze vorbestrahlter

Wurzelspitzen auf, in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung. Dabei bestätigte sich ihnen das Phänomen von der hemmenden Wirkung großer Röntgendosen.

Für das Weiterstudium dieser Erscheinungen (zumal sich in den Fachbüchern der Botanik eine klare Bestätigung der physiologischen Mitosenrhythmen nicht finden läßt) und um die ausgedehnten Berner - Untersuchungen über das Längenwachstum der Vicia faba equina nach dieser neuen Richtung hin zu erweitern, haben wir in größerem Maßstabe die Mitosenuntersuchungen an unseren Bohnenstämmen begonnen.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lautete die Problemstellung:

1. Besteht ein physiologischer Tagesrhythmus in der Mitosenzahl bei Vicia faba equina?
2. Wie ist die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Kernteilungsablauf?
   a) Drückt sich die Wachstumsbeschleunigung durch kleine Dosen auch in der Erhöhung der Mitosenprozentsätze aus?
   b) Tritt mit der Wachstumshemmung auch eine Verminderung der Mitosenprozentsätze auf?
   c) Sind diese Veränderungen der Mitosenprozentsätze den makroskopischen Wachstumsveränderungen proportional?

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546502_0040

II. Die Versuchsreihen und deren Ergebnisse

A. Versuche zur Beantwortung von Frage 1:

Studium der Mitosenverhältnisse unbestrahlter Wurzelkeimlinge der Vicia faba equina.

1. Das Prinzip: Während 5 Tagen wurden alle 3 Stunden je 4 Wurzelspitzen gleichaltriger Bohnenkeimlinge abgeschnitten und fixiert, alsdann gefärbt und die Mitosenprozentsätze errechnet.

2. Die Technik der Versuche:

a) Die Schaffung von Sägemehlkulturen.

400 Samen von Vicia faba equina wurden durch 24-stündiges Einlegen in stehendem Wasser zur Quellung gebracht. Die gequollenen Samen lagen drei Tage lang eingebettet auf feuchtem, sterilen Sägmehl, gedeckt mit naßem Fließpapier, aufbewahrt in der Dunkelkammer. In diesem gleichmäßig feuchten Milieu erreichten die aus den Samen hervorgebrochenen Keimlinge am dritten Tage eine durchschnittliche Länge von zirka 8 mm. Nach Ausscheidung der noch nicht oder schlecht keimenden Samen erfolgte die Umpflanzung in Glasgefäße. Diese Gefäße waren 18 cm hoch, 10 cm lang und 3,5 cm breit. Sie wurden mit Fließpapier ausgekleidet und mit feuchtem Sägemehl gefüllt. Die Verpflanzung der Keimlinge erfolgte in die obersten Sägemehlschichten, derart, daß die Würzelchen durch ausgestanzte Oeffnungen des Fließpapiers zwischem diesem und der Glaswand zu liegen kamen und so der Beobachtung und Meßung ständig zugänglich blieben, ohne daß man sie deshalb im Wachstum hätte stören können. Das Vorwärtsstoßen der Wurzeln gegen den Boden blieb ungehemmt, da ihr Weg entlang senkrecht eingesetzten Glasstäbchen ein vorgezeichneter und gebahnter war.

Je 6 Keimlinge wuchsen zusammen in einem solchen Glase, also auf jeder Breitseite deren drei. Die ganze Saat wurde in einem nahezu konstanten Milieu gehalten: Dunkelkammer, Temperaturschwankungen nur zwischen 20 und 22 Grad, Barometerschwankungen zwischen 765 und 767 mm Hg (reduziert auf Meeresniveau).

Für die Methodik der Herstellung, Fixation und Färbung der Schnitte hat uns Hr. P. D. Dr. von Büren vom botanischen Institut der Universität Bern in verdankenswerter Weise alle wünschbaren Angaben gemacht.

b) Die Fixation der Wurzelspitzen geschah in der Weise, daß alle drei Stunden je 4 Spitzen mit einer Länge von 8 mm in die Fixierungsflüssigkeit gebracht wurden. Als solche fand die Flemmingsche Lösung Verwendung (Chromsäure 2 % 280.0, Osmiumsäure 2 % 25.0. Eisessig 12.0. Aqua dest. 210.0).

Die 4 zur gleichen Zeit geschnittenen und fixierten Wurzelspitzen kamen zusammen in ein kleines Glasgefäßchen, jede Schnittgruppe erhielt eine Nummer und diese begleitete sie in Form eines ansteckbaren Fähnchens durch alle Stadien der Fixierung, Entwässerung und Färbung. Verwechslungen waren dadurch praktisch ausgeschlossen. Die Dauer der Fixierung betrug durchwegs 24 Stunden.

c) Das Ueberführen in Paraffin.

Die Auswaschung der fixierten Objekte vollzog sich unter sanft fließendem Wasserstrahl und dauerte eine Stunde. Die Entwässerung der Objekte verlangte größte Gründlichkeit. Die Wurzelspitzen blieben im Minimum je zwei Stunden in 30, 50, 70, 85, 96%igem Alkohol und darnach je zwei Stunden in absolutem Alkohol. Dieser erhielt in den nächsten 24 Stunden einen steigenden Chloroformanteil (1/4, 1/2, 3/4). Schließlich lagen die Objekte einen Tag lang in reinem Chloroform, einen Tag in Chloroformparaffin (zu gleichen Teilen), bis sie dann in flüßiges 53-grädiges Paraffin eingelegt wurden, wo sie fünf Tage blieben. Das Paraffin wurde täglich etwas umgerührt. Die Temperatur des Thermostaten betrug 57 ° C.

d) Das Einbetten.

Nach Ablauf der fünf Tage wurden Paraffin und Objekte in die mit Glyzerin in dünner Schicht bestrichenen Einbettungsrähmchen gegossen. Solange das Paraffin noch flüssig war, konnte den Objekten mit erhitzten Nadeln die gewünschte Lage gegeben werden. Die vier Wurzelspitzen wurden so gelagert, daß

sie ganz nahe nebeneinander und auf gleiche Höhe zu liegen kamen. Daraufhin erfolgte die beschleunigte Erstarrung des Paraffins durch Eintauchen des Rähmchens in kühles Wasser. Nach Abkühlung lösten sich die Paraffinblöcke spontan von ihrer Unterlage.

e) Das Aufblocken und Schneiden.

Jeder Paraffinblock wurde durch schichtweises Abtragen des Paraffins in eine vierseitige Form gebracht. Rings um die Objekte blieb eine 2 mm dicke Paraffinschicht erhalten. Das Aufblocken auf Holzwürfel geschah durch Ankleben der untersten Paraffinschicht mittels eines heißen Spatels. Mit diesem wurden dann auch die Ränder der Klebeflächen verstrichen.

Das Schneiden erfolgte mit dem Mikrotom in einer Schnittdicke von 0.01 mm. Es wurden durchwegs Längsschnitte hergestellt und darauf geachtet, daß besonders die medianen Partien der Wurzelspitze zur Untersuchung kamen. In diesem Sinne wurden die Schnitte vor dem Aufkleben auf die Objektträger sortiert und eventuell ausgeschieden.

f) Das Aufkleben der Schnitte auf die Objektträger.

Die durch mehrstündiges Einlegen in 5 %ige Chromsäure gereinigten und entfetteten Objektträger waren alle zum voraus mit Aetztinte numeriert worden. Als Klebestoff für die Paraffinbänder diente Eiweißglycerin (ein Gemisch von Hühnereiweiß und Glycerin zu gleichen Teilen), von welchem ein stecknadelkopfgroßer Tropfen auf dem Objektträger zu einer kaum sichtbaren Schicht verstrichen war. Die so vorbereiteten Objektträger wurden mit einem Tropfen Leitungswasser beschickt, die Schnitte auf dem Wasser mit Hilfe kleiner Pinsel ausgebreitet und in zwei oder drei Reihen angeordnet. Die Beseitigung des überschüssigen Wassers erfolgte durch Absaugen mit Fließpapier.

Durch kurzes Halten über der Spiritusflamme erreichte man eine Streckung der etwa noch schrumpfigen Paraffinbänder und ein glattes Sich-Anschmiegen an das Glas.

Der endgültige Klebeprozeß erfolgte durch exakt horizontales Einlegen der Objektträger in den Thermostaten (15 Min.).

wobei das Eiweiß zur Gerinnung kam. Darauf erfolgte rasche Abkühlung. In dieser Form können die Schnitte unbegrenzte Zeit aufbewahrt werden, falls nicht unmittelbar mit dem Färben begonnen wird.

g) Das Färben der Schnitte nach dem Dreifarbenverfahren.

(Saffranin / Gentianaviolett / Orange - G).

Ein 10-Minuten-Bad in Xylol befreite die Schnitte vom Paraffin. Zwecks Ueberführung in wässerige Lösungen blieben sie darnach je 5 Minuten in 90,50, 30%igem Alkohol. Auf ein kurzes Wasserbad folgte die Bleichung in 5 %igem Wasserstoffsuperoxyd. Dieser Bleichungsprozeß dauerte meistens eine Stunde: die Zellkerne, welche durch die fixierende Osmiumsäure eine schwärzliche Farbe angenommen hatten, wurden nun wieder farblos. Die nochmals in Wasser gespülten Objekte wurden anschließend gebeizt, indem man sie für vier Stunden in eine 1%ige Chromsäure legte. Die gebeizten Schnitte bedurften vor der eigentlichen Färbung einer halbstündigen Auswaschung in fließendem Wasser.

Das eigentliche Färben begann mit einem 12—15 stündigen Bade der Objekte in gesättigter, wässeriger Saffraninlösung. Die sattroten Schnitte wurden zunächst für kurze Zeit in ein Gefäß mit Wasser A gestellt, darauf 2—3 mal in 96%igem Alkohol geschwenkt, mit Salzsäurealkohol (1 Tropfen konz. HCl auf 100 ccm Alkohol) betropft, dann nochmals in Alkohol gebadet und schließlich für einige Minuten in das Gefäß mit Wasser B gestellt. (Wasser A und Wasser B sind zunächst gleich. Sobald sie aber gebraucht werden, muß eine Verwechslung ausgeschlossen sein, weil sich im Wasser B infolge der Spülung kleine HCl-Mengen befinden.) Aus dem Wasser B wurden die Schnitte für eine genau erprobte Zeit (3 –5—7 Minuten) in eine gesättigte, wässerige Lösung von Gentianaviolett gebracht, daraufhin in Wasser A gespült. Das nun folgende Auftropfen von wässeriger Orange-G-Lösung bedurfte ebenfalls der peinlichen Dosierung: nach 3 Sekunden mußte die aufgetropfte Lösung in die Flasche zurückgegossen werden. Die Differenzierung geschah durch Beschicken der Objektträger mit 96%igem Alkohol; solange, bis die Schnitte eine typische, schmutzig - violette Farbe angenommen hatten und der Alkohol farblos abtropfte. Dieser Farbum-

schlag erfolgte fast augenblicklich. Eine zu lange Anwendung des Alkohols machte die Färbung unbrauchbar.

Die gefärbten Objekte lagen zur Aufhellung 5 Minuten in Nelkenöl. Nach Abtropfen und Absaugen des Oels wurden die Ränder und Rückseiten der Objektträger mit einem Leinenläppchen von den restlichen Oel- und Farbmengen befreit und die Schnitte mit Zedernöl und Deckglas eingebettet.

h) Das Auszählen.

Aus den vier gleichzeitig abgeschnittenen Wurzelspitzen waren auf die oben erwähnte Weise 30—60 Medianschnitte hergestellt worden. Die mediansten und bestgefärbten Schnitte wurden für die Untersuchung ausgewählt. Das Auszählen von Nachbarschnitten wurde vermieden. Zone der Zählung war die Zellgruppe zwischen Plerom und Kalyptra bezw. Epidermis, bis 3 mm hinter der Spitze, also Vegetationspunkt und Kambium.

Als Optik diente Okular 5 und Objektiv 6 L des Leitzmikroskopes (Vergrößerung 225). Das Zählen konnte durch Einsatz eines Papierfensters von 16 mm² Flächeninhalt in das Okular erleichtert werden.

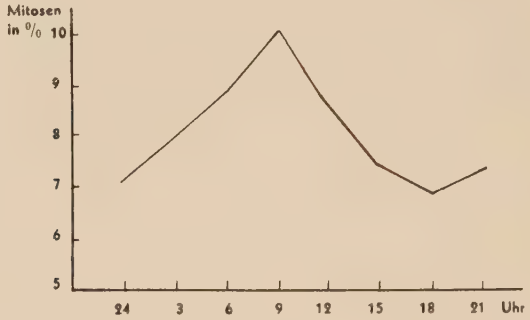
Zur Auszählung kamen jeweils zirka 10 Gesichtsfelder mit zusammen 500 Zellen. Das Verhältnis aller gezählten Zellen zu den gezählten Mitosen ergab den für die Aufstellung der Kurven gültigen Prozentsatz. Als Mitosen wurden nur Teilungsfiguren im Stadium deutlicher Fadenbildung angesprochen, also nicht alle Stufen der Kernbewegung. Die Zählung aller Phasen (von der Stufe der Prochromosomen bis zur Plasmateilung) war bei allen Schnitten zunächst versucht worden. Die Abhängigkeit der Resultate von der Färbung war dabei so groß, daß nur ein Teil der Schnitte verwendet werden könnten. Deshalb wurde diese Zählart verlassen.

3. Die Resultate der ersten Versuchsreihe: der normale Mitosenrhythmus.

Die Fixierungen waren alle 3 Stunden durchgeführt worden. Die Untersuchung umfaßt also täglich 8 Zeitpunkte: 12.00, 15.00, 18.00 h usw. Ortszeit (also 13.30, 16.30, 19.30 usw. Sommerzeit).

Bei graphischer Darstellung (Textskizze 1. Kurve 1 im Anhang) ergibt die Verbindung der für die verschiedenen Tages-

zeiten errechneten Mitosenprozentsätze eine wellenförmige Kurve: dem Wellenberg am Vormittag entspricht ein Wellental am Abend. Alle 5 Tage der Untersuchung zeigen diese eingipflige Kurve. Der Mittelwert der Mitosen beträgt 8.1 %, die größte Abweichung der Welle von der Mittellage 2 % (Amplitude).



Skizze 1. Mitoseprozentsätze in Abhängigkeit von der Tageszeit.

Die Kurve entspricht prinzipiell jener, die Jüngling und Langendorff gefunden haben: beide sind eingipflig und zeigen ein Maximum am Tage und ein Minimum in der Nacht. Bei Jüngling und Langendorff ist das Maximum jedoch ein 6 - Stunden - dauerndes, also plateauartig, Anstieg und Abfall deshalb viel steiler. Die Mittellage beträgt 11 %, die Amplitude 2.4 %.

Dieser sich alltäglich wiederholende Rhythmus im Ablauf der Kernteilungen kann nicht mit einer unmittelbaren Einwirkung des direkten oder des diffusen Sonnenlichtes erklärt werden; denn die Saaten waren ständig in der Dunkelkammer gehalten worden.

Ob nun dieser Rhythmus auf innern Faktoren der Pflanze (Einfluß der Pflanzenmneme) oder aber auf irgendwelchen meteorologischen Einflüssen beruht, das bleibt ungewiß. Verwundern müßte ein völliges Konstantbleiben dieser Vorgänge; denn das Nacheinander von Leistung und Erholung ist doch ein allgemeines biologisches Phänomen.

B. Versuche zur Beantwortung der Frage 2:

Studium des Kernteilungsablaufes röntgenbestrahlter Keimlinge der Vicia faba equina.

Was wird geschehen, wenn eine kleine Röntgendosis von 20 r auf die Keimlinge eingewirkt hat? Wird sich das Phänomen vom Reize kleiner Dosen bei Betrachtung der Mitosenverhältnisse bestätigen? Werden die Mitosenwellen rascher aufeinanderfolgen, täglich des öftern ein Maximum erreichen? Oder werden sie den gleichen Rhythmus zeigen, jedoch auf einem höheren Ausgangspunkte basieren? Ist überhaupt ein Einfluß auf den Kernteilungsablauf zu sehen? Denn ein rascheres Wachstum kann doch auch auf rein plasmatischen Veränderungen beruhen, zum Beispiel im Sinne der Vergrößerungen einzelner Zellen?

Was bewirken die höheren Dosen, die Strahlen von 150 r? Werden alle Mitosen gleich beeinflußt? Oder sterben jene einer gewissen Zone ab, während andere im Wachstum gereizt werden? Gestalten sich die Mitosenwellen flacher, werden sie seltener? Oder ist nur ihr Ausgangspunkt gesenkt?

Entspricht die Größenordnung der gefundenen Aenderungen jenen, welche sich aus dem Studium des täglichen Längenzuwachses ergaben? Bestehen klare Proportionen?

Der Abklärung dieser Fragen dienten vier Versuchsserien mit Keimlingen derselben Saat:

1. Serie: Mitosenstudium nach Bestrahlung mit 20 r.
2. Serie: Mitosenstudium nach Bestrahlung mit 150 r.
3. Serie: Mitosenstudium unbestrahlter Keimlinge (Kontrolle).
4. Serie: Keimungsversuch mit bestrahlten und unbestrahlten Wurzeln zur Meßung des täglichen Längenzuwachses (Kontrolle).

a) Technische Besonderheiten gegenüber dem Grundversuch.

Die Bestrahlung erfolgte unmittelbar vor der Umpflanzung der 4 Tage alten Keimlinge in die Glasgefäße. Die Anordnung war folgende: Stickrahmen von ungefähr 15 cm Durchmesser wurden mit Cellophanpapier bespannt, darauf eine 1 — 2 cm dicke Schicht feuchtes Sägemehl gehäuft und darnach die Keimlinge so hingelegt, daß die Spitzen der radiär geordneten Wurzeln gegen die Rahmenmitte gerichtet waren. Diese Anordnung

ermöglichte eine gleichzeitige Bestrahlung von 20 — 30 Keimlingen. Eine gleichmäßige Dosierung war gegeben durch den festgelegten Abstand der Wurzelspitzen von der Rahmenmitte, auf welche die Strahlung zentriert wurde. Die Dosis wurde während der Bestrahlung dauernd gemessen.

Die Bestrahlung erfolgte mit der Intensität von 10 r / min. Die eine Serie war ihr während 2, die andere während 15 Minuten unterworfen. Daraus resultierten die Dosen von 20 r und von 150 r.

Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die ersten Wurzelspitzen geschnitten und fixiert. Die übrigen in die Glasgefäße umgepflanzt. Nach einer halben Stunde wurden weitere Keimlinge fixiert, dann wieder nach 1, 2, 4, 7 usw. Stunden bis 95 Stunden nach Bestrahlung. J ü n g l i n g und L a n g e n d o r f f untersuchten ihre Objekte bis angeblich 220 Stunden nach Bestrahlung. Diese längere Beobachtung wurde bei unsern Versuchen bewußt unterlassen. Denn die am schnellsten wachsenden Pfahlwurzeln hatten am 4. Tage nach der Umpflanzung den Boden der Glasgefäße erreicht, standen von diesem Zeitpunkt an also unter andern äußeren Bedingungen als die übrigen: sie waren im Wachstum gehemmt, rollten sich ein, kehrten um, bildeten Ranken. Ein Vergleich mit den andern war deshalb nicht mehr möglich. Vom 4. Tage an zeigte sich auch, daß bei den am weitesten fortgeschrittenen Pflanzen die Seitenwurzeln schon eine große Ueppigkeit erreicht hatten; dort aber, wo diese Ueppigkeit besonders ausgesprochen war, änderte sich das Bild der Pfahlwurzel: sie wurde fadendünn, gelb und matt. Das mikroskopische Bild war nicht verwertbar: es schien verfilzt, Zellkerne waren kaum zu finden (auch nicht bei der unbestrahlten Serie). J ü n g l i n g und L a n g e n d o r f f geben nicht an, wie alt die Keimlinge bei der Bestrahlung gewesen sind. Wir bestrahlten am 5. Tage nach der Quellung.

Für jeden Zeitpunkt wurden 3 mal je 2 Wurzelspitzen geschnitten, je zwei von den beiden bestrahlten Serien, je zwei von der Kontrollserie. Die Gesamtzahl der untersuchten Wurzeln dieser Serien betrug 200.

Mit Keimlingen derselben Saat wurde gleichzeitig als weitere Kontrolle und als Brücke zu den früheren Untersuchungen am hiesigen Institut ein Keimungsversuch durchgeführt: die Messung des täglichen Längenzuwachses der Wurzeln bei je 12

Pflanzen der beiden bestrahlten und der unbestrahlten Serie. Dies geschah nach Art der Arbeiten von Doelken, Lenherr, Salzmann und Hauser.

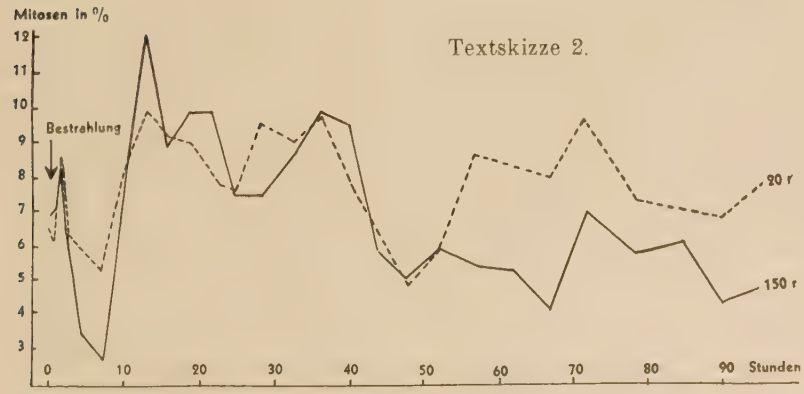
b) Die Ergebnisse.

1. Der Kontrollversuch mit unbestrahlten Keimlingen ergab (Kurve 2 im Anhang) Mitosenprozentsätze, welche sich bei graphischer Darstellung in eine Kurve fügen, die wellenförmig verläuft und täglich einen Gipfel und eine Senke zeigt. Diese Kurve gleicht also ganz jener des Grundversuches. Das Mitosenmaximum liegt ebenfalls im Vormittag, das Minimum vor Mitternacht. Am dritten und vierten Untersuchungstag verliert sich die Deutlichkeit der Wellenform etwas, da von diesen Tagen an die Zeitpunkte der Einzeluntersuchungen weiter auseinanderliegen. Die durchschnittliche Mitosenzahl beträgt 7.9 %.

2. Die Bestrahlung mit der Dosis von 20 r führte zu einer makroskopisch erfaßbaren Wachstumsbeschleunigung, gemessen an der täglichen Längenzunahme der Wurzel (Kurve 5 im Anhang). Dies entspricht ganz den Ergebnissen früherer, ausgedehnterer Versuche am hiesigen Institut. So fand Doelken bei dem gleichen Pflanzenstamm und bei gleicher Bestrahlungsdosis eine durchschnittliche Wachstumsbeschleunigung von zirka 7 %. Und zwar:

am 1. Tage 4 %	am 3. Tage 6 %
am 2. Tage 5 %	am 4. Tage 10 %

Textskizze 2.



Die Untersuchung der Mitosenprozentsätze ergab keine entsprechende quantitative Aenderung. Hingegen änderte sich das Bild der Mitosenkurve (Textskizze 2. Kurve 3 im Anhang):

Eine halbe Stunde nach Bestrahlung fällt die 20 - r - Kurve kurz und leicht, zeigt nach einer Stunde eine sehr spitze Zacke (Anstieg von 6.6 % auf 8.6 %) und fällt dann während der folgenden 6 Stunden kontinuierlich bis auf 5.3 %. Diese erste Zacke darf wohl als «Primäreffekt» im Sinne von Jüngling und Langendorff angesprochen werden. Der ihr folgende Abfall entspräche dann der mitosenarmen Zwischenzeit (Jüngling und Langendorff sprechen bei Anwendung höherer Dosen von einer mitosenfreien Zwischenzeit). Das neue, relativ hohe Maximum von 10 %, welches 13 Stunden nach Bestrahlung auftritt, kann entsprechend «Sekundäreffekt» genannt werden. Der darauf folgende Abfall der Kurve führt zu einem Minimum in der 25. Stunde; ein sehr relatives Minimum allerdings, wie ein Sattel zwischen zwei Höhen. Die 28. und 36. Stunde bringen ein zweigipfliges Maximum (Tertiäreffekt im Sinne obiger Autoren?). Das absolute Minimum der Kurve liegt in der 48. Stunde bei 4.8 %. Ihm folgen in der 57. und 72. Stunde nochmals zwei Wellenberge. Nach 96 Stunden steht die Kurve auf der gleichen Höhe wie jene des Kontrollversuches.

Der Gesamtdurchschnitt der gezählten Mitosen weicht kaum von jenem des Kontrollversuches ab. Er beträgt 7.7 % (7.9 %). Eine Aenderung zeigt sich in der Form der Kurve. Der Tagesrhythmus ist nicht mehr zu erkennen, es haben sich andere und neue Wellenberge und Wellentäler gebildet. In den ersten 48 Stunden finden sich 4 Maxima, also das Doppelte des Kontrollversuches. Dieses Auftreten von 2 Wellenbergen pro Tag deuteten Jüngling und Langendorff als eine Beschleunigung des Kernteilungsablaufes. Ob nun der Ablauf der einzelnen Mitose ein rascherer geworden ist oder ob nur das Aufeinanderfolgen neuauftretender Mitosen eine Beschleunigung erfahren hat, darauf können die Kurven keine Antwort geben. Denn sie sind ja Resultanten vielfacher Vorgänge. Eine Verlängerung im Ablauf der einzelnen Mitose — isoliert gedacht — müßte den Wellenberg erhöhen. Eine Abkürzung der Mitosendauer wird zunächst ein Sinken der Kurve zur Folge haben. So wäre es auch denkbar, daß ein beschleunigter Ablauf der einzelnen Mitose und das vermehrte Auftreten neuer Mitosen so inein-

andergreifen, daß sich die Kurve weder nach oben noch nach unten wendet. Diese Hypothese erklärt vielleicht auch die Tatsache, daß die Gesamtzahl der Mitosenprozentsätze bei der bestrahlten und bei der unbestrahlten Serie praktisch die gleiche ist, obschon sich das Wachstum verschieden verhält.

3. Der Bestrahlung mit der Dosis von 150 r

folgte eine deutliche Wachstumshemmung (Kurve 5 im Anhang). Diese Hemmung beträgt zirka das Vierfache der Beschleunigung nach der 20 - r - Strahlung. Klarer als durch die Kurve unseres Keimungsversuches wird dies bei Betrachtung der Zahlen, die Doelken gefunden hat. Die durchschnittliche Wachstumshemmung des täglichen Längenwachstums gibt er mit 40 % an. Der zeitliche Verlauf dieser Hemmung ist folgender:

am 1. Tage 29 %	am 3. Tage 53 %
am 2. Tage 33 %	am 4. Tage 68 %

Diesem Befunde entsprechen nun auch die Mitosenprozentsätze. Auch diese zeigen (Kurve 6 im Anhang) ein allmählich steiler werdendes Absinken. Es beträgt am 3. Tage z. B. 30 %.

Die kurvenmäßige Darstellung der Mitosenprozentsätze (Textskizze 2. Kurve 4 im Anhang) ergibt in ihrer Form eine Steigerung des 20 - r - Bildes. Die Maxima und Minima treten zur gleichen Zeit nach der Bestrahlung auf, vor allem am Anfang, sie sind jedoch viel ausgesprochener.

Eine Stunde nach Bestrahlung haben die steigenden Mitosenprozentsätze ein erstes Maximum erreicht. Es liegt bei 8.5 % und entspricht dem «Primäreffekt» der Kurve von Jüngling und Langendorff. Ihm folgt im Laufe der nächsten 6 Stunden ein Abfall zu dem absoluten Mitosenminimum der Kurve. Dieses beträgt 2.8 %. Nach der mitosenarmen Zwischenzeit steigt die Kurve rasch und erreicht in der 13. Stunde ihre absolute Höhe bei 12.1 %. Jüngling und Langendorff haben dieses zweite Maximum den «Sekundäreffekt» genannt. Darnach fällt die Kurve, zeigt in der 19.—22. Stunde eine Nachzacke und führt dann in der 25. — 28. Stunde zu einem Wellental. Ein drittes Maximum (Tertiäreffekt?) zeigt die 36. Stunde. In der Folge sinkt die Mitosenzahl tief unter den Durchschnitt der 0 - Kurve und bleibt in der Tiefe. Die Zeitpunkte liegen nun etwas weiter auseinander. Die Kurve zeigt kein typisches Bild mehr.

Die Mitosen des zweiten Maximums, also des «Sekundäreffektes» wurden von Jüngling und Langendorff teilweise als «krank» befunden. In jenen Arbeiten ist jedoch nicht erwähnt, aus welchen Symptomen diese Diagnose gestellt worden ist. Die her untersuchten Serien haben nichts Diesbezügliches gezeigt. Jüngling und Langendorff fanden solche «kranke» Mitosen nach Bestrahlung mit 175 r und mit höheren Dosen.

Nur eine Wurzelspitze der 150-r-Serie zeigte eine auffallende, pathologische Veränderung. Es war dies eine kolbenförmige Verdickung des Wurzelendes. Die mikroskopische Untersuchung ergab eine Wucherung des Vegetationspunktes. Die Beschaffenheit der einzelnen Mitose schien jedoch nicht verändert.

Ein Vergleich unserer 150-r-Kurve mit jener, welche Jüngling und Langendorff nach einer Bestrahlung mit 150 r gefunden haben, ist nicht ohne weiteres angängig. Einerseits müßte man die Differenz von 25 r in der Dosierung berücksichtigen, andererseits wissen wir viel zu wenig über die Einzelheiten in der Versuchsordnung von Jüngling und Langendorff.

Maß und Wechsel von Maxima und Minima sind in beiden Kurven ganz analog. Unsere Kurve weicht jedoch im zeitlichen Verlaufe ab. Sie verläuft 2—3 mal rascher. Die erste Zacke tritt bei Jüngling und Langendorff ebenfalls eine Stunde nach Bestrahlung auf und liegt bei 9.2 % (8.6 %). Ihr folgt ein ähnliches, starkes Absinken der Kurve, doch dauert dieses 14 (6) Stunden. Erst nach weiteren 6 Stunden beginnt die Kurve wieder zu steigen. Das zweite Maximum stellt sich 48 (13) Stunden nach der Bestrahlung ein und liegt bei 11.5 % (12.1 %). Die 72. Stunde (36) bringt die 3. Wellenhöhe.

Der raschere Verlauf unserer Kurve beruht vielleicht auf dem Unterschied von 25-r in der Dosierung. Denn bei den 420- und 550-r-Kurven von Jüngling und Langendorff tritt der Sekundäreffekt noch später auf (60 Stunden nach Bestrahlung).

4. Der Vergleich beider Kurven und daraus gezogene Schlüsse.

Beim Vergleichen der 20-r-Kurve mit jener, welche nach der Bestrahlung mit 150 r gefunden worden ist, drängt sich eine

Hypothese auf. Der Verlauf beider Kurven ist in den ersten 50 Stunden ein ähnlicher. Die Ausschläge der 150-r-Kurve sind zwar größer, gehen jedoch nach der gleichen Richtung wie jene der 20-r-Kurve. Es geht also nicht an, die eine Kurve im Sinne einer Reizung, die andere im Sinne einer Hemmung zu deuten. Es scheint vielmehr, daß beide zunächst die Folge einer Reizung sind.

Die erste Zacke, eine Stunde nach Bestrahlung, könnte hervorgerufen sein durch einen beschleunigten Ablauf der besonders empfindlichen Mitosenvorstadien, also durch eine raschere Mitosenreifung. Es würden also zuerst die jüngeren Phasen (Prophase) beeinflußt. Greift diese Beschleunigung auf die Anaphase über, so muß die Kurve sinken. Das Minimum der 7. Stunde wäre also demnach der Zeitpunkt, wo die Mitosen teilweise ein vorschnelles Ende gefunden haben. Auf diese Weise könnte das Auftreten des «Primäreffektes» und der mitosenarmen Zwischenzeit erklärt werden.

Der «Sekundäreffekt» tritt 12 Stunden nach dem «Primäreffekt» auf, also nach einer gewissen Latenzzeit. Bei der 20-r-Kurve liegt er auf der Höhe des normalen Tagesmaximums, jedoch um 6 Stunden vorverlegt. Bei der 150-r-Kurve zeigt er eine überragende Form. Dieser «Sekundäreffekt» ist bei beiden Kurven wohl ebenfalls eine Folge der Reizung, ein Mitosenschub, vielleicht die 2. Generation des «Primäreffektes». Die Tatsache, daß bei noch höherer Bestrahlungsdosis (175—550 r) nach den Angaben von Jüngling und Langendorff viele Mitosen dieses Maximums «krank» sind, spricht vielleicht dafür.

Das darauf folgende Absinken der 150-r-Kurve mag einem Erschöpfungszustand zu vergleichen sein; wie ja in der Biologie auf künstliche Reizung hin meist eine pathologische Hemmung folgt.

Das Wachstum der Wurzeln wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, hauptsächlich durch die Zahl der sich in Mitose befindenden Zellen einerseits und durch die Ablaufsgeschwindigkeit der Zellteilung andererseits. Unsere Betrachtungsweise gibt jedoch nur ein «Momentbild» dieses Produktes. Das Eliminieren eines dieser beiden Faktoren wird bei Vicia faba equina nicht möglich sein; denn es gelingt nicht, die Dauer der einzelnen Mitose zu bestimmen. Dazu müßte ein Objekt in vivo untersucht werden können.

In unserem Bild würde eine Zunahme der Mitosenzahl bei gleicher Ablaufgeschwindigkeit den Prozentsatz erhöhen, eine Beschleunigung des Ablaufes bei gleicher Mitosenzahl den Prozentsatz erniedrigen. Wird nun aber durch die Strahlung die Mitosenzahl erhöht und gleichzeitig der Ablauf beschleunigt, so ergibt sich uns möglicherweise das gleiche «Momentbild» wie bei einer unbestrahlten Serie. Dasselbe Bild könnte sich umgekehrt aber auch ergeben bei einer Erniedrigung der Mitosenzahl und einer gleichzeitigen Verzögerung im Ablauf der einzelnen Mitose.

Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, daß diese beiden hauptsächlichen Faktoren (Mitosenzahl und Ablaufsgeschwindigkeit) synchron in Erscheinung treten. Dadurch, daß nur eine bestimmte Phase der Kernteilung betrachtet wurde, wird diese Möglichkeit noch geringer.

Ob nun die Röntgenstrahlen einen bestimmten Wachstumsfaktor mobilisieren oder ob das biologische Objekt mit zwei verschiedenen Reaktionen auf die Röntgenstrahlen anspricht, kann aus dem Ergebnisse dieser Arbeit allein nicht entschieden werden. Die erstere Auffassung scheint nach den vorstehenden Ergebnissen wahrscheinlicher, da ja der Mitosenverlauf bei beiden Röntgendosen (20 r und 150 r) im Wesentlichen ein ähnlicher ist, obschon die eine Dosis makroskopisch reizt, die andere aber das Wachstum hemmt.

III. Zusammenfassung.

Durch Messung des täglichen Längenzuwachses röntgenbestrahlter Wurzelkeimlinge der Vicia faba equina wurde in früheren Arbeiten am hiesigen Institut festgestellt, daß kleine Dosen das Wachstum beschleunigen, daß große Dosen hemmen und daß die Zwischenwerte das Wachstum praktisch unbeeinflußt lassen. Dieses Phänomen wurde durch das Studium des Kernteilungsablaufes näher betrachtet.

Die Ergebnisse sind die folgenden:

1. Die Mitosenprozentsätze unbestrahlter Wurzelspitzen der Vicia faba equina zeigen regelmäßige, tageszeitliche Schwankungen im Sinne eines mittäglichen Maximums und eines nächtlichen Minimums. Der Mittelwert der Mi-

tosen beträgt 8.1 %. Die Amplitude der Tageskurve beträgt durchschnittlich 2 %.

2. Durch die Einwirkung der Röntgenstrahlen wird der physiologische Mitosenrhythmus verändert: die Amplitude wird größer und der Rhythmus beschleunigt.

a) Die Wachstumsbeschleunigung durch kleine Dosen (20 r) drückt sich nicht in einer Erhöhung der Mitosenprozentsätze aus. Hingegen wird der Mitosenrhythmus ein rascherer; die Tageskurve zeigt zwei Wellenberge und zwei Wellentäler, also das Doppelte der unbestrahlten Serie. Die Amplitude beträgt 3 % der Gesamtzellenzahl.

b) Mit der Wachstumshemmung durch grössere Dosen (150 r) tritt zunächst keine Verminderung der Mitosenprozentsätze auf. Die Mitosenrhythmen sind anfänglich jedoch viel rascher und größer. Die Amplitude beträgt 5.5 % der Gesamtzellenzahl. Erst 50 Stunden nach der Bestrahlung sinken die Mitosenprozentsätze von 7.6 % auf 5.3 %.

IV. Literaturverzeichnis.

1. von Büren: Die Herstellung von pflanzlichen Dauerpräparaten. (Botanisches Institut der Universität Bern).

2. Jüngling O. und H. Langendorff: Ueber die Wirkung verschieden hoher Röntgendosen auf den Kernteilungsablauf bei Vicia faba equina. Strahlentherapie, Bd. 38. 1930.

3. Doelken Karl: Der Einfluß der Röntgenstrahlen auf das Längenwachstum der Vicia faba equina. Dissertation. (Röntgeninstitut der Universität Bern.) 1941.

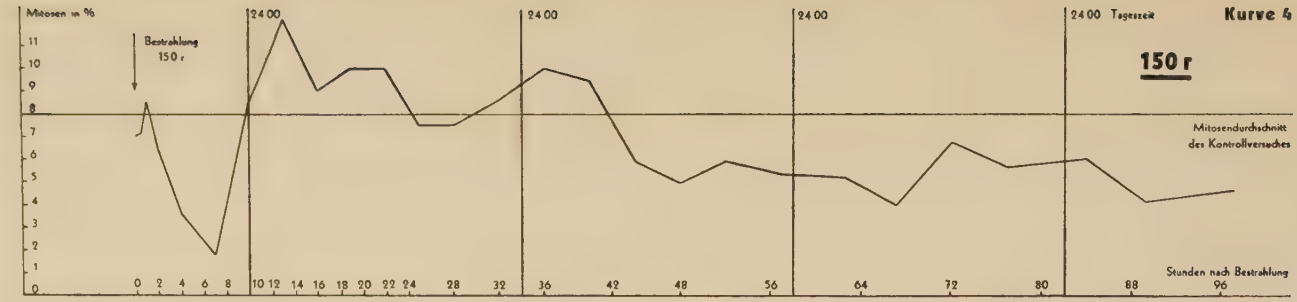
4. Salzmann Hs.: Strahlenbiologische Versuche mit Vicia faba equina. Dissertation 1940. (Röntgeninstitut der Universität Bern).

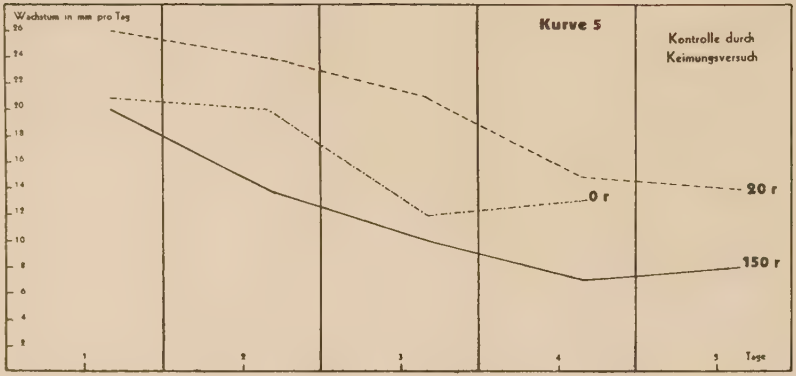
5. de Simoni: Strahlenbiologische Versuche mit Triticum vulgare. Dissertation. Bern 1941.

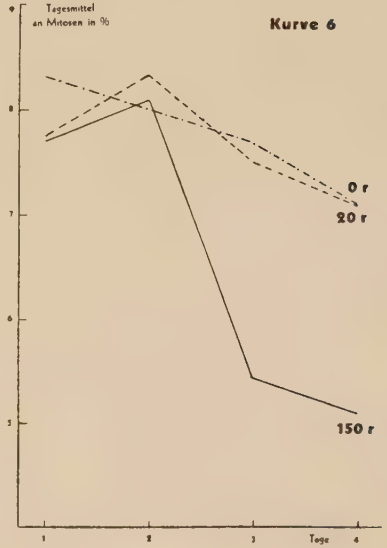
6. Hauser: Strahlenbiologische Versuche mit Vicia faba equina mit besonderer Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit. Dissertation. Bern 1941.

Mitosenprozentsätze nach Bestrahlung

Zeit nach Bestrahlung	Dosis 0 r	Dosis 20 r	Dosis 150 r
0 Minuten	—	6.6 %	7 %
30 Minuten	—	6.4 %	7.1 %
1 Stunde	7.6 %	8.6 %	8.5 %
2 Stunden	—	6.3 %	6.4 %
4 Stunden	6.7 %	6.1 %	3.6 %
7 Stunden	7.3 %	5.3 %	2.8 %
10 Stunden	8 %	8.7 %	8.6 %
13 Stunden	9.4 %	10 %	12.1 %
16 Stunden	7.8 %	9.1 %	9 %
19 Stunden	10.4 %	9 %	10 %
22 Stunden	8.6 %	8 %	10 %
25 Stunden	7.8 %	7.7 %	7.5 %
28 Stunden	6.4 %	9.5 %	7.5 %
32 Stunden	5.8 %	9 %	8.6 %
36 Stunden	7.2 %	9.8 %	10 %
40 Stunden	9.7 %	7.7 %	9.5 %
44 Stunden	10.4 %	6.3 %	5.9 %
48 Stunden	8.9 %	4.8 %	5 %
52 Stunden	7.1 %	5.8 %	5.9 %
57 Stunden	7 %	8.5 %	5.4 %
62 Stunden	7.4 %	8.3 %	5.3 %
67 Stunden	7.4 %	7.9 %	4 %
72 Stunden	—	9.6 %	6.8 %
77 Stunden	5.5 %	7.1 %	5.7 %
83 Stunden	8.4 %	—	6 %
89 Stunden	—	6.7 %	4.2 %
96 Stunden	7.4 %	7.5 %	4.6 %


Mitosen in %
Bestrahlung
150 r
24 00
24 00
24 00
24 00 Tageszeit
Kurve 4
150 r
Mitosendurchschnitt
des Kontrollversuches
Stunden nach Bestrahlung
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 28 32 36 42 48 56 64 72 80 88 96


Wachstum in mm pro Tag
Kurve 5
Kontrolle durch
Keimungsversuch
20 r
0 r
150 r
Tage


Tagesmittel
an Mitosen in %
Kurve 6
0 r
20 r
150 r
Tage